

ESTABELECIMENTO DE CULTURAS ASSÉPTICAS DE *Aspidosperma polyneuron*

ESTABLISHMENT OF ASEPTIC CULTURES OF *Aspidosperma polyneuron*

Luciana Lopes Fortes Ribas¹ Flávio Zanette² Luiz Kulchetski³ Miguel Pedro Guerra⁴

RESUMO

O presente trabalho objetivou estabelecer um protocolo para obtenção de culturas assépticas de *Aspidosperma polyneuron* visando à regeneração *in vitro* de mudas dessa espécie. Brotações apicais de mudas de dois anos de idade foram coletadas em casa de vegetação e desinfestadas com hipoclorito de sódio (NaOCl) ou cloreto de mercúrio (HgCl₂) visando ao estabelecimento de culturas assépticas. Os tratamentos testados com NaOCl foram: solução 0,125 ou 0,25%, durante cinco ou dez minutos e com HgCl₂: 0,025; 0,05 ou 0,1%, durante cinco ou dez minutos e em todas as estações do ano. As avaliações das percentagens de necrose, contaminação fúngica, contaminação bacteriana e de sobrevivência foram feitas após três semanas. Os resultados revelaram que o tratamento com solução de NaOCl a 0,25%, durante 10 minutos, resultou em 70% de sobrevivência para brotações apicais, independente da época do ano (verão e outono). O HgCl₂ foi mais eficiente que o NaOCl na desinfestação de brotações apicais de peroba-rosa, sendo recomendado o tratamento de 0,05% de HgCl₂, durante 10 minutos (84,10% de sobrevivência). Em todas as estações do ano, foram estabelecidas culturas assépticas, contudo, os melhores resultados foram obtidos na primavera e verão.

Palavras-chave: peroba-rosa, micropropagação, explante juvenil, desinfestação.

ABSTRACT

The objective of the present work was to obtain aseptic cultures in order to establish a micropropagation protocol of *Aspidosperma polyneuron* from juvenile explants. Apical shoots from two-year-old seedlings were collected in a greenhouse and disinfected with sodium hypochlorite (0.125 or 0.25%) or mercuric chloride (0.025, 0.05 or 0.1%), during 5 or 10 minutes and at different seasons of the year. Necrosis, bacterial and fungal contamination percentages and survival rates were evaluated after three weeks. It was showed that NaOCl 0.25% solution, during 10 minutes resulted in 70% of survival and disinfection of apical shoots, independent of the season of the year (summer or autumn). HgCl₂ was more efficient than NaOCl in the disinfection of apical shoots, therefore 0.05% HgCl₂, during 10 minutes was recommended (84.10% of survival). Aseptic cultures were established in all seasons of the year, but better results were obtained in spring and summer.

Key words: peroba, micropropagation, juvenile explant, disinfection.

INTRODUÇÃO

A *Aspidosperma polyneuron* Müll. Arg. pertencente à família Apocynaceae é conhecida popularmente como peroba-rosa. Trata-se de uma espécie nativa, característica da Floresta Estacional Semidecidual, na formação submontana. Essa espécie apresenta importância econômica por sua madeira de excelente qualidade, muito usada na indústria de móveis, em construção civil, construção naval e em carpintaria. A extração madeireira, agricultura, pecuária e expansão urbana são as principais causas da exploração desordenada, colocando essa espécie na lista de plantas ameaçadas de extinção (Carvalho, 1994; Hatschbach e Ziller, 1995).

1. Bióloga, Dr^a., Professora Adjunta do Departamento de Botânica, Universidade Federal do Paraná, Caixa Postal 19031, CEP 81531-970, Curitiba (PR). lfribas@bio.ufpr.br
2. Engenheiro Agrônomo, Dr., Professor Titular do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Universidade Federal do Paraná, CEP 80035-050, Curitiba (PR). flazan@ufpr.br
3. Engenheiro Florestal, PhD., Professor Adjunto do Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Campus de Uvaranas, Av. Carlos Cavalcanti, 4748, CEP 84030-900, Ponta Grossa (PR). luizkulc@uepg.br
4. Engenheiro Agrônomo, Dr., Professor Titular do Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, CEP 88040-900, Florianópolis (SC). mpguerra@cca.ufsc.br

Recebido para publicação em 7/11/2001 e aceito em 18/11/2002.

A peroba-rosa apresenta dificuldades de propagação natural por causa da irregularidade na sua frutificação, produzindo grande quantidade de sementes a intervalos de quatro anos; sua coleta é de difícil execução (em consequência do grande porte das árvores porta-sementes), apresentando, geralmente, baixo poder germinativo quando semeadas (35-70%). O crescimento lento e a dificuldade no enraizamento de estacas são alguns dos problemas que impedem a reposição dessa espécie (Carvalho, 1994).

A micropropagação de plantas é uma técnica que possibilita a propagação massal de genótipos selecionados. No entanto, a contaminação por microorganismos continua sendo um dos principais problemas para a aplicação dessa técnica, podendo chegar inclusive a ser um fator limitante para o estabelecimento e cultivo *in vitro* de certos explantes. Várias substâncias com ação germicida são usadas para fazer a desinfestação dos explantes. As mais comuns são os compostos à base de cloro, tais como o hipoclorito de sódio e de cálcio. Outros agentes desinfestantes incluem: cloreto de mercúrio, ácido clorídrico e peróxido de hidrogênio (Montarroyos, 2000). Outros fatores determinantes para a escolha do tipo de tratamento de desinfestação são a idade da planta matriz, a época do ano e o local de coleta (George, 1993).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da época do ano e de agentes desinfestantes para obtenção de culturas assépticas visando ao estabelecimento de um protocolo de micropropagação dessa espécie, partindo do cultivo de brotações apicais.

MATERIAL E MÉTODO

Seleção de plantas matrizes

Em janeiro de 1992, 200 plantas selecionadas de *Aspidosperma polyneuron*, com dois anos de idade, procedentes do viveiro da Universidade Estadual de Londrina – PR, foram colocadas em casa-de-vegetação climatizada, modelo Van der Hoeven, pertencente ao Laboratório de Micropropagação Vegetal, no Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

Após um período de adaptação de 15 dias, as plantas foram podadas para estimular a formação de brotações novas e pulverizadas com 0,5 g.L⁻¹ de benomyl, a cada 15 dias.

Experimento 1

Efeito do hipoclorito de sódio na desinfestação de brotações apicais realizada no verão e no outono

As brotações apicais de 2 a 4 cm de comprimento foram coletadas de plantas de peroba-rosa e submetidas aos tratamentos assépticos de imersão em soluções de NaOCl (0,125 e 0,25%), durante cinco ou dez minutos. Os tratamentos foram realizados em duas épocas do ano: no final do verão (fevereiro) e no outono (abril).

As soluções de NaOCl foram acrescidas de 0,1% de tween 20, e as brotações permaneceram em agitação durante a realização dos tratamentos. Em seguida, foram feitas seis lavagens em água deionizada esterilizada. As brotações foram cortadas em sua extremidade basal e colocadas em tubos de ensaio contendo o meio de cultura WPM (Lloyd e McCown, 1980).

As avaliações da percentagem de necrose, de contaminação fúngica, de contaminação bacteriana e de sobrevivência foram feitas após três semanas.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2 x 2 x 2 com cinco repetições e trinta brotações por parcela. As médias foram comparadas pela análise de variância com o teste F para contrastes ortogonais. Para as análises estatísticas, os dados foram transformados em $(x+0,5)^{1/2}$, conforme recomendação de Steel e Torrie (1980).

Experimento 2

Efeito do cloreto de mercúrio na desinfestação de brotações apicais realizada durante diferentes estações do ano

Brotações apicais foram coletadas em casa de vegetação, trazidas para câmara de fluxo laminar e submetidas aos tratamentos assépticos com três concentrações de HgCl₂ (0,025; 0,05 e 0,1%), em períodos de 5 e 10 minutos e testados em quatro diferentes épocas do ano (outono, inverno, primavera e verão). Os

tratamentos foram feitos em agitação e acrescentou-se 0,1 % de tween 20 nas soluções desinfestantes. Em seguida foram feitas seis lavagens com água deionizada esterilizada. As brotações foram cortadas em sua extremidade basal e colocadas em tubos de ensaio contendo meio de cultura WPM (Lloyd e McCown, 1980).

As avaliações das percentagens de necrose, contaminação fúngica e bacteriana e de sobrevivência foram feitas após três semanas.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 3 x 2 x 4, com quatro repetições e trinta brotações por parcela. As médias foram comparadas pela análise de variância, pelo Teste F para contrastes ortogonais e Teste de Tukey. Para as análises estatísticas, os dados foram transformados em $(x+0,5)^{1/2}$.

Meio de cultura

Empregou-se como meio basal o meio de cultura WPM (Lloyd e McCown, 1980), suplementado com sacarose 3%, mio-inositol (0,01%) e solidificado com ágar (0,65%). O pH foi ajustado em 5,8 antes da autoclavagem do meio de cultura.

Condições de cultivo

As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas, fornecido por lâmpadas fluorescentes do tipo branca fria, com densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos de $40 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ao nível das culturas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento 1

Efeito do hipoclorito de sódio na desinfestação de brotações apicais realizada no verão e outono

A percentagem de necrose dos tratamentos de desinfestação de brotações de peroba-rosa com NaOCl (0,125 e 0,25%) apresentou interação significativa com os tempos de 5 e 10 minutos, realizados no verão e outono (Teste F, $P \leq 0,05$). A percentagem de necrose das brotações desinfestadas com 0,25% de NaOCl durante 5 minutos foi superior à obtida com a concentração de 0,125% e também em relação ao tempo de 10 minutos (Tabela 1).

TABELA 1: Intensidade de necrose (%) de brotações apicais de *Aspidosperma polyneuron* desinfestadas com duas concentrações de NaOCl (0,125 e 0,25%) a intervalos de 5 e 10 minutos em duas diferentes épocas do ano (verão e outono).

TABLE 1: Necrosis intensity (%) of apical shoots of *Aspidosperma polyneuron* disinfected with two concentrations of NaOCl (0.125 and 0.25%), at intervals of 5 or 10 minutes in two different seasons of the year (summer and autumn).

Concentração (%)	Tempo (min.)	
	5	10
0,125	8,15 b A	14,85 a A
0,25	17,19 a A	9,42 a B
CV = 32,65%	-	-

Em que: CV = Coeficiente de Variação; Médias com letras minúsculas diferentes nas colunas ou maiúsculas diferentes nas linhas diferem significativamente pelo Teste F ($P \leq 0,05$).

Em relação à percentagem de contaminação fúngica das brotações apicais, os tratamentos testados nas duas épocas do ano não apresentaram diferenças significativas, variando entre 11,27 e 24,40%. No entanto, concentração e época foram significativos para percentagem de contaminação bacteriana (Teste F, $P \leq 0,05$). O efeito do tratamento com 0,25% de NaOCl foi de reduzir a contaminação bacteriana das brotações, quando comparado com 0,125% de NaOCl. Em relação à época do ano, no outono ocorreu uma redução na percentagem de contaminação bacteriana (Tabela 2).

TABELA 2: Contaminação bacteriana (%) de brotações apicais de *Aspidosperma polyneuron* desinfestadas com duas concentrações de NaOCl (0,125 e 0,25%) a intervalos de 5 e 10 minutos em duas diferentes épocas do ano (verão e outono).

TABLE 2: Bacterial contamination (%) of apical shoots of *Aspidosperma polyneuron* disinfected with two concentrations of NaOCl (0.125 and 0.25%), at intervals of 5 or 10 minutes in two different seasons of the year (summer and autumn).

Concentração (%)	Contaminação bacteriana (%)
0,125	8,22 a
0,25	2,27 b
<i>Época</i>	-
Verão	7,75 a
Outono	2,55 b
CV = 44,67%	-

Em que: CV = Coeficiente de Variação; Médias com letras diferentes diferem significativamente pelo Teste F ($P \leq 0,05$).

A análise de variância da percentagem de sobrevivência das brotações apicais desinfestadas com NaOCl revelou significância estatística para a interação da concentração x tempo (Teste F, $P \leq 0,05$). Tanto no verão como no outono, o tratamento de imersão em solução de 0,25% de NaOCl, durante 10 minutos resultou na mais alta percentagem de sobrevivência (71,53%), sendo significativamente superior ao nível de 0,125% e ao tempo de 5 minutos (Tabela 3).

TABELA 3: Sobrevivência (%) de brotações apicais de *Aspidosperma polyneuron* desinfestadas com duas concentrações de NaOCl (0,125 e 0,25%) a intervalos de 5 e 10 minutos em duas diferentes épocas do ano (verão e outono).

TABLE 3: Survival rate (%) of apical shoots of *Aspidosperma polyneuron* disinfected with two concentrations of NaOCl (0.125 and 0.25%), at intervals of 5 or 10 minutes in two different seasons of the year (summer and autumn).

Concentração (%)	Tempo (min.)	
	5	10
0,125	61,46 a A	56,88 b A
0,25	56,99 a B	71,53 a A
CV = 9,45%	-	-

Em que: CV = Coeficiente de Variação; Médias com letras minúsculas diferentes nas colunas ou maiúsculas diferentes nas linhas diferem significativamente pelo Teste F ($P \leq 0,05$).

Uma análise conjunta das variáveis avaliadas permitindo concluir que o tratamento de imersão em NaOCl a 0,25% durante 10 minutos pode ser recomendado para a desinfestação de brotações de peroba-rosa, tanto no verão como no outono, tendo em vista que esse tratamento proporcionou a mais baixa percentagem de contaminação fúngica e bacteriana e a mais elevada percentagem de sobrevivência.

Experimento 2

Efeito do cloreto de mercúrio na desinfestação de brotações apicais realizada durante diferentes estações do ano

A avaliação da percentagem de necrose dos tratamentos de desinfestação com $HgCl_2$ em brotações de peroba-rosa, realizados durante o ano revelou diferenças significativas para os fatores tempo, época e para interação tempo x época (Teste F, $P \leq 0,05$).

Em relação à época do ano constatou-se que as maiores percentagens de necrose das brotações ocorreram no inverno e outono. Dos tratamentos realizados durante 5 minutos, a mais baixa percentagem de necrose foi obtida na primavera, diferindo significativamente da do inverno. Para o tempo de 10 minutos, as percentagens de necrose obtidas na primavera e verão foram significativamente inferiores às do outono e inverno. Dos tratamentos realizados no outono, a percentagem de necrose obtida durante o tempo de 10 minutos foi significativamente superior à do tempo de 5 minutos (Tabela 4).

TABELA 4: Influência da estação do ano na intensidade de necrose (%) das brotações apicais de *Aspidosperma polyneuron* desinfestadas com HgCl₂, sob três concentrações (0,025%; 0,05% e 0,1%) a intervalos de 5 e 10 minutos de duração.

TABLE 4: Influence of the season of the year on necrosis intensity (%) of apical shoots of *Aspidosperma polyneuron* disinfected with three concentrations of HgCl₂ (0.025%; 0.05% and 0.1%) at intervals of 5 or 10 minutes.

Época do Ano	Tempo (min.)	
	5	10
Verão	9,31 a b A	7,49 b A
Outono	10,23 a b B	20,00 a A
Inverno	16,10 a A	19,51 a A
Primavera	7,29 b A	9,17 b A
CV = 26,99%	-	-

Em que: CV = Coeficiente de Variação; Médias com letras minúsculas diferentes nas colunas e letras maiúsculas diferentes nas linhas diferem significativamente pelo Teste de Tukey (P≤0,05).

As avaliações da percentagem de contaminação fúngica das brotações de peroba-rosa, obtidas após os tratamentos de desinfestação com HgCl₂, foram estatisticamente significativas para os fatores concentração, época do ano e para as interações concentração x época (Teste F, P≤0,05).

Em relação à época do ano, a percentagem de contaminação fúngica das brotações desinfestadas com 0,025% de HgCl₂ no verão foi significativamente inferior à do outono e inverno. Os tratamentos com 0,1% de HgCl₂ realizados no outono apresentaram percentagens de contaminação fúngica superiores às obtidas nas outras épocas do ano (Tabela 5).

TABELA 5: Influência da estação do ano na contaminação fúngica (%) das brotações apicais de *Aspidosperma polyneuron* desinfestadas com HgCl₂, sob três concentrações (0,025%; 0,05% e 0,1%) a intervalos de 5 e 10 minutos de duração.

TABLE 5: Influence of the season of the year on fungi contamination (%) of apical shoots of *Aspidosperma polyneuron* disinfected with three concentrations of HgCl₂ (0.025%; 0.05% and 0.1%) at intervals of 5 or 10 minutes.

Época do Ano	Concentração (%)		
	0,025	0,05	0,1
Verão	7,64 c	6,22 a	5,88 b
Outono	20,66 a	8,43 a	15,75 a
Inverno	18,46 a b	1,98 a	4,69 b
Primavera	8,75 b c	3,72 a	1,79 b
CV = 39,66%	-	-	-

Em que: CV = Coeficiente de Variação; Médias com letras diferentes nas colunas diferem significativamente pelo Teste de Tukey (P≤0,05).

A análise de variância da percentagem de contaminação bacteriana das brotações apicais de peroba-rosa desinfestadas com HgCl₂ foi significativa para os fatores concentração, tempo e época e para interação concentração x tempo (Teste F, P≤0,05). Em relação à época do ano, as brotações submetidas às concentrações de HgCl₂ testadas no outono apresentaram as menores percentagens de contaminação bacteriana, diferindo significativamente das obtidas no verão (Tabela 6).

Das concentrações de HgCl₂ testadas, as percentagens de contaminação bacteriana das brotações apresentaram diferenças nos tratamentos realizados durante 5 minutos, sendo que a concentração de 0,05% foi a que apresentou a mais baixa percentagem (Teste F para contrastes ortogonais, P≤0,05). No entanto, as percentagens de contaminação bacteriana das brotações nos tratamentos testados durante 10 minutos, em todas as épocas do ano, não apresentaram diferenças significativas. Em relação ao tempo de tratamento, a percentagem de contaminação bacteriana das brotações obtida com o tratamento de 0,025% de HgCl₂ durante 10 minutos foi inferior à do tempo de 5 minutos (Tabela 6).

TABELA 6: Influência do tempo de tratamento e época do ano na contaminação bacteriana (%) das brotações apicais de *Aspidosperma polyneuron* desinfestadas com HgCl₂, sob três concentrações (0,025%; 0,05% e 0,1%) a intervalos de 5 e 10 minutos de duração.

TABLE 6: Influence of treatment time and the time of the year on bacterial contamination (%) of apical shoots of *Aspidosperma polyneuron* disinfected with three concentrations of HgCl₂ (0.025%; 0.05% and 0.1%) at intervals of 5 or 10 minutes.

Tempo (min.)	Concentração (%)		
	0,025	0,05	0,1
5	7,51 a	1,79 a	4,08 a
10	2,16 b	2,10 a	3,23 a
<i>Época do ano</i>	-		
Verão	5,01 a		
Outono	1,31 b		
Inverno	3,89 a b		
Primavera	3,43 a b		
CV = 54,59%	-		

Em que: CV = Coeficiente de Variação; Médias com letras diferentes nas colunas diferem significativamente pelo Teste de Tukey (P≤0,05).

A análise de variância da percentagem de sobrevivência de brotações apicais de peroba-rosa desinfestadas com HgCl₂ foi significativa para os fatores concentração, época e para interação concentração x época (Teste F, P≤ 0,05).

As brotações de peroba-rosa submetidas aos tratamentos de desinfestação com 0,025% de HgCl₂, realizados na primavera e no verão apresentaram as mais altas percentagens de sobrevivência. A percentagem de sobrevivência obtida pelo tratamento com 0,05% de HgCl₂, na primavera, foi significativamente superior à do outono. Com a concentração de 0,1% de HgCl₂, a percentagem de sobrevivência das brotações obtida na primavera foi superior à do outono e inverno. Dos tratamentos realizados no outono e no inverno, as percentagens de sobrevivência obtidas com 0,05% foram significativamente superiores às da concentração de 0,025% (Tabela 7).

TABELA 7: Influência da época do ano na sobrevivência (%) das brotações de *Aspidosperma polyneuron* desinfestadas com HgCl₂, sob três concentrações (0,025%; 0,05% e 0,1%) a intervalos de 5 e 10 minutos de duração.

TABLE 7: Influence of the time of the year on survival (%) of apical shoots of *Aspidosperma polyneuron* disinfected with three concentrations of HgCl₂ (0.025%; 0.05% and 0.1%) at intervals of 5 or 10 minutes.

Tempo (min.)	Concentração (%)		
	0,025	0,05	0,1
Verão	73,93 a	79,90 a b	76,37 a b
Outono	58,47 b	70,25 b	66,48 b
Inverno	53,57 b	76,79 a b	67,65 b
Primavera	79,49 a	84,10 a	80,20 a
CV = 8,51%	-	-	-

Em que: CV = Coeficiente de Variação; Médias com letras diferentes nas colunas diferem significativamente pelo Teste de Tukey, (P≤0,05).

A primavera e o verão foram as melhores épocas do ano para a desinfestação de brotações apicais de peroba-rosa com HgCl₂. A análise de todas as variáveis avaliadas indicaram que o tratamento com 0,05% de HgCl₂ durante 10 minutos, foi o mais eficiente para a desinfestação das brotações apicais.

De uma maneira geral, os tratamentos de desinfestação foram eficientes, possibilitando a obtenção de elevadas taxas de sobrevivência das brotações (50-85%), indicando, com isso, que podem ser obtidas culturas assépticas durante o ano inteiro. Essa é uma das vantagens de utilizar técnicas de micropropagação

para a regeneração *in vitro* de mudas de peroba-rosa. Essa espécie demonstrou ser sensível às concentrações elevadas das soluções desinfestantes e ao tempo de tratamento, sendo utilizadas concentrações mais reduzidas de NaOCl e HgCl₂ do que as utilizadas para muitas espécies lenhosas, como foi citado para *Carpinus betulus* e *Fraxinus excelsior* (0,1% de HgCl₂ por 20 a 40 minutos – Chalupa, 1990), *Miscanthus sinensis* (1,5% de NaOCl por 20 minutos - Nielsen *et al.*, 1993), *Maytenus ilicifolia* (0,25% NaOCl por 30 minutos - Pereira *et al.*, 1995) e *Cercis canadensis* (0,5% de NaOCl 15 minutos – Mackay *et al.*, 1995), entre outras. Segundo George (1993), a concentração e o tempo de exposição aos desinfestantes dependem do material vegetal, sendo que, diferentes partes da planta apresentam respostas variadas quanto à sensibilidade dos tecidos. Uma desinfestação eficiente elimina os microorganismos e não causa danos ou morte dos tecidos. No presente trabalho, a concentração intermediária de HgCl₂ testada (0,05%) foi a que apresentou os melhores resultados, tendo em vista que, com a concentração de 0,025%, foram obtidas as maiores percentagens de contaminação fúngica e bacteriana e com 0,1%, as maiores percentagens de necrose das brotações apicais de peroba-rosa.

O cloreto de mercúrio foi mais eficiente do que o hipoclorito de sódio na desinfestação de brotações apicais de peroba-rosa. No entanto, por ser um produto tóxico, deve ser utilizado com muita cautela (George, 1993). Esse produto vem sendo utilizado, com sucesso, para muitas espécies lenhosas que apresentavam sérios problemas de contaminação por microorganismos como relatado por Bennett e Davies JR. (1986), Chalupa (1990), Purohit *et al.* (1994) e Patnaik e Debata (1996).

No primeiro experimento com NaOCl, a estação do ano não influenciou os resultados obtidos com a peroba-rosa. No entanto, no segundo experimento, os tratamentos realizados na primavera e verão foram os que apresentaram as maiores taxas de sobrevivência dos explantes (>80%), apesar de que em todas as estações do ano também foram obtidos resultados satisfatórios (50 a 85%). Resultados semelhantes aos da peroba-rosa foram obtidos por Hutchinson (1984), com explantes de brotações de maçã que contaminavam menos na primavera ou verão, do que no outono ou inverno. Qurashi *et al.* (1996) também constataram que a contaminação das culturas de *Cleistanthus collinus* dependia da estação do ano, sendo que a taxa máxima ocorreu no outono e a mínima na primavera. Geralmente, os níveis de contaminação são mais baixos quando as plantas estão na fase de crescimento ativo. Segundo Cassells (1991), em tecidos juvenis, a contaminação endofítica é mais baixa do que em tecidos maduros.

Alguns estudos revelaram que a época de coleta também pode interferir na taxa média de regeneração de brotações. Meier e Reuther (1994) constataram que as brotações de *Fagus sylvatica* coletadas no verão induziram maiores taxas médias de regeneração *in vitro* quando comparadas com às do inverno.

Os resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo com as recomendações feitas por Bonga (1987), que a retirada de explantes deve ser feita preferencialmente partindo de brotações novas que são formadas durante a fase ativa de crescimento da planta, após o final da fase de dormência, durante a primavera e verão.

As brotações apicais de peroba-rosa foram estabelecidas *in vitro*, possibilitando a regeneração de brotações axilares em meio de cultura WPM. As brotações apicais também foram adequadas para o estabelecimento e indução de brotações múltiplas de *Quercus robur* (Vieitez *et al.*, 1985), *Eucalyptus microcorys*, *Banksia serrata* e *B. oblongifolia* (Niccol *et al.*, 1994) e *Fagus sylvatica* (Meier e Reuther, 1994). A eficiência do estabelecimento de culturas assépticas é essencial para prosseguir nas outras etapas da micropropagação.

CONCLUSÕES

O tratamento com solução de hipoclorito de sódio a 0,25% durante 10 minutos foi satisfatório (71,53% de sobrevivência) para a desinfestação de brotações apicais de peroba-rosa, independente da época do ano (verão e outono).

O cloreto de mercúrio foi mais eficiente que o hipoclorito de sódio na desinfestação de brotações apicais de peroba-rosa, sendo recomendado o tratamento de 0,05% HgCl₂ durante 10 minutos (84,10% de sobrevivência). Em todas as estações do ano, foram estabelecidas culturas assépticas, no entanto, os melhores resultados foram obtidos na primavera e verão.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Edilson B. de Oliveira pela orientação da análise estatística. À CAPES pela concessão de bolsa de estudos. Ao Dr. Luiz Antônio Biasi pela revisão do artigo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BENNETT, L. K.; DAVIES JR., F. T. *In Vitro* propagation of *Quercus shumardii* seedlings. **Hortscience**, Alexandria, v. 21, n. 4, p. 1045-1047, 1986.
- BONGA, J. M. Clonal propagation of mature trees: problems and possible solutions. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. **Cell and tissue culture in forestry**. Netherlands: Martinus Nijhoff, 1987. p. 249-271.
- CASSELLS, A. C. Problems in tissue culture. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. **Micropropagation**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991. p. 31-43.
- CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Colombo: EMBRAPA-CNPQ, 1994.
- CHALUPA, V. Micropropagation of Hornbeam (*Carpinus betulus* L.) and Ash (*Fraxinus excelsior* L.). **Biol. Plant.**, Prague, v. 32, n. 5, p. 332-338, 1990.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: the technology**. Great Britain: Exegetics Limited, 1993. v. 1.
- HATSCHBACH, G. G.; ZILLER, S. R. **Lista vermelha de plantas ameaçadas de extinção no Estado de Paraná**. Curitiba: SEMA/GTZ, 1995. 139p.
- HUTCHINSON, J. F. Factors affecting shoot proliferation and root initiation in organ cultures of the apple "Northern Spy". **Sci. Hortic.**, Amsterdam, v. 22, p. 189-194, 1984.
- LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture. **Comb. Proc. Intl. Plant. Prop. Soc.**, v. 30, p. 421-427, 1980.
- MACKAY, W. A.; TIPTON, J. L.; THOMPSON, G.A. Micropropagation of Mexican redbud, *Cercis canadensis* var. *mexicana*. **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, Dordrecht, v. 43, p. 295-299, 1995.
- MEIER, K.; REUTHER, G. Factors controlling micropropagation of mature *Fagus sylvatica*. **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, Dordrecht, v. 39, p. 231-238, 1994.
- MONTARROYOS, A. V. V. Contaminação *in vitro*. **AbctpNotícias**, n. 36, p. 5-10, 2000.
- NICCOL, R. J.; REGAN, P. A.; DE FILIPPIS, L. F. Simplified protocol for the micropropagation of selected *Eucalyptus* and *Banksia* species. **Aust. For.**, Canberra, v. 57, n. 4, p. 143-147, 1994.
- NIELSEN, J. M.; BRANDT, K.; HANSEN, J. Long-term effects of thidiazuron are intermediate between benzyladenine, kinetin or isopentenyladenine in *Miscanthus sinensis*. **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, Dordrecht, v. 35, p. 173-179, 1993.
- PATNAIK, J.; DEBATA, B. K. Micropropagation of *Hemidesmus indicus* (L.) R. Br. through axillary bud culture. **Plant Cell Rep.**, Heidelberg, v. 15, p. 427-430, 1996.
- PEREIRA, A. M. S.; MORO, J. R.; CERDEIRA, R. M. M.; FRANÇA, S. C. Effect of phytohormones and physiological characteristics of the explants on micropropagation of *Maytenus ilicifolia*. **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, Dordrecht, v. 42, p. 295-297, 1995.
- PUROHIT, S. D.; KUKDA, G.; SHARMA, P.; TAK, K. *In vitro* propagation of an adult tree *Wrightia tomentosa* through enhanced axillary branching. **Plant Sci.**, Limerick, v. 103, p. 67-72, 1994.
- QURAIISHI, A.; KOCHÉ, V.; MISHRA, S. K. *In vitro* micropropagation from nodal segments of *Cleistanthus collinus*. **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, Dordrecht, v. 45, p. 87-91, 1996.
- STEEL, R. G. D.; TORRIE, J. H. **Principles and procedures of statistics**. New York: McGraw-Hill, 1980. 633p.
- VIEITEZ, A. V.; SAN-JOSE, M. C.; VIEITEZ, E. *In vitro* plantlet regeneration from juvenile and mature *Quercus robur*, L. **J. Hortic. Sci.**, England, v. 60, n. 1, p. 99-106, 1985.